

# **Auswirkungen des Phosphoinositid-3-Kinase- $\delta$ - Inhibitors Idelalisib auf Phänotyp und Funktion Dendritischer Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Christiane Braun**

aus Bergisch Gladbach

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Annkristin Heine
2. Gutachter: Prof. Florian Ingo Schmidt, PhD

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.08.2023

Aus der Klinik und Poliklinik III – Innere Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Brossart

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	4
1. Deutsche Zusammenfassung .....	6
1.1 Einleitung .....	6
1.2 Material und Methoden .....	8
1.2.1 Proben .....	8
1.2.2 Medien und Reagenzien.....	8
1.2.3 Generierung dendritischer Zellen .....	9
1.2.4 Immunfärbungen .....	9
1.2.5 Färbung von Kern und Zytoskelett .....	9
1.2.6 Messung der Zytokin-Produktion .....	9
1.2.7 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) .....	9
1.2.8 Bestimmung der Apoptoserate .....	10
1.2.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting.....	10
1.2.10 Statistische Analyse .....	10
1.3 Ergebnisse .....	11
1.3.1 Modulation der Differenzierung und der LPS-induzierten Reifung.....	11
1.3.2 Reduktion der allogenen T-Zell-Aktivierung durch monozytäre DC.....	14
1.3.3 Idelalisib verändert die Zytokinsekretion LPS-gereifter DC .....	16
1.3.4 Idelalisib hemmt den NFκB-Signalweg .....	17
1.4 Diskussion.....	18
1.4.1 Therapielimitierungen bei Einsatz von Idelalisib .....	18
1.4.2 Einfluss von Idelalisib auf das Immunsystem .....	18
1.4.3 Neue Einsatzgebiete der PI3Kδ-Inhibitoren.....	21
1.5 Zusammenfassung .....	22
1.6. Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung .....	23
2. Veröffentlichung.....	27
3. Danksagung .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

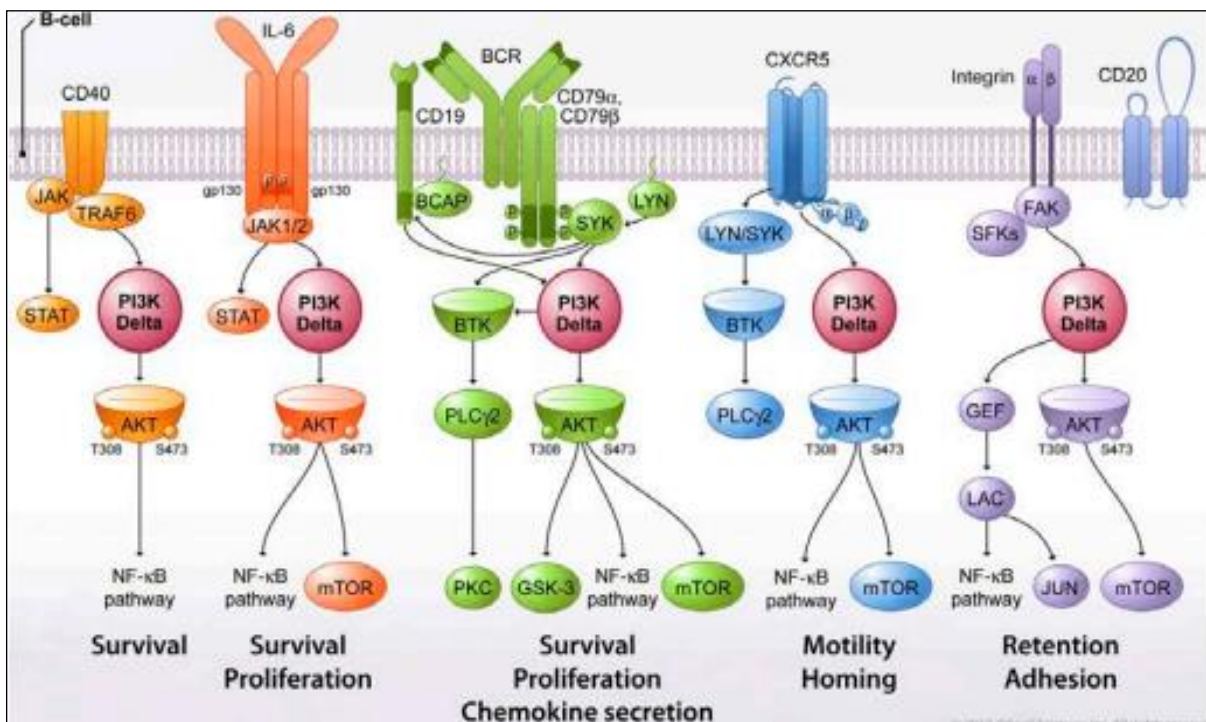
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
ANZ	absolute Neutrophilenzahl
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BCL	B-Zell-Lymphom
BCR	B-Zell-Rezeptor
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CXCR	Chemokin-Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FL	Folikuläres Lymphom
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
JAK	Janus Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LYN	<i>Lyn tyrosine kinase</i>
MFI	<i>Mean Fluorescent Intensity</i>
MLR	<i>Mixed Lymphocyte Reaction</i> , Gemischte Lymphozytenreaktion

moDC	monozytäre dendritische Zellen
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PI	Propidium Jodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PJ	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
PJP	<i>Pneumocystis-jirovecii</i> -Pneumonie
PKB	Proteinkinase B
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640 Medium</i>
SFK	<i>Src-Family Kinase</i>
SLL	<i>Small Lymphocytic Lymphoma</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SYK	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TC	zytotoxische T-Zellen
T <sub>H</sub> 2	T-Helfer-2-Zellen
TLR-9	<i>Toll Like Receptor 9</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
WHO	Weltgesundheitsorganisation

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Bei Non-Hodgkin-Lymphomen wie dem folliculären Lymphom (FL), der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und dem kleinzelligen lymphozytischen Lymphom (engl. small lymphocytic lymphoma – SLL), das von der WHO zur CLL gerechnet wird, handelt es sich um hämatologische Malignome, die durch eine unkontrollierte Proliferation klonaler B-Zellen gekennzeichnet sind. Sie führen in den meisten Fällen zu indolenten Lymphadenopathien und können prinzipiell jedes Organ betreffen, was sich in der großen Vielfalt klinischer Symptome widerspiegelt (Armitage et al., 2017). In den vergangenen Jahrzehnten haben sich die therapeutischen Möglichkeiten der Non-Hodgkin-Lymphome weiterentwickelt: von der klassischen Chemotherapie über die Immuntherapie hin zur zielgerichteten Therapie (engl. targeted therapy). Einen Angriffspunkt solcher zielgerichteten Therapien für B-Zell-Malignome stellt die Phosphatidylinositol-3-Kinase delta (PI3K $\delta$ ) dar (Herman et al., 2010). Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist eine Tyrosinkinase, die die Phosphorylierung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) katalysiert. PIP<sub>3</sub>



**Abb. 1:** PI3K $\delta$  und ihre nachgeschalteten Signalwege. Mit freundlicher Genehmigung der Gilead Sciences GmbH (©2013, Gilead Sciences Inc. All rights reserved)

wiederum aktiviert u.a. die Proteinkinase B (PKB, entspricht AKT) und hierüber die nachgeschalteten Signalwege mTOR und NFκB, siehe Abb. 1.

Die katalytische Untereinheit der PI3K kommt in vier Isoformen vor: Die Isoformen α und β werden in vielen Geweben exprimiert, die Isoformen γ und δ hingegen überwiegend in hämatopoetischen Zellen. Ein Charakteristikum der B-Zell-Lymphome ist ein hyperaktiver PI3Kδ-Signalweg. An dieser Stelle entfaltet Idelalisib, ein sogenanntes ‚small molecule‘, das die PI3Kδ hemmt, seine Wirkung. In der Behandlung von FL und CLL mit Idelalisib konnten bemerkenswerte klinische Ergebnisse erzielt werden (Furman et al., 2014; Gopal et al., 2014), so dass im September 2014 die Zulassung seitens der EMA für folgende drei Anwendungsgebiete bei erwachsenen Patient:innen erfolgte: zur Behandlung der CLL in Kombination mit einem monoklonalen anti-CD20-Antikörper (Rituximab) (1) nach mindestens einer vorangegangenen Therapie oder (2) als Erstlinientherapie bei Vorliegen einer 17p-Deletion oder einer TP53-Mutation bei Patient:innen, für die eine Chemoimmuntherapie ungeeignet ist sowie (3) als Monotherapie zur Behandlung eines FL, das refraktär nach zwei vorausgegangenen Therapielinien ist (European Medicines Agency, 2014).

Unter Therapie mit Idelalisib in Kombination mit einer klassischen Immunchemotherapie waren jedoch signifikant erhöhte Infektionsraten, beispielsweise mit Cytomegalievirus (CMV) und *Pneumocystis jirovecii* (PJ), zu verzeichnen (de Weerd et al., 2017). Im März 2016 schließlich veröffentlichte der Hersteller Gilead Sciences GmbH einen Rote-Hand-Brief zur Einschränkung der Anwendung von Idelalisib (Zydelig®), nachdem drei Studien zu neuen Kombinationsschemata bzw. anderweitigen Patient:innenpopulationen aufgrund einer erhöhten Anzahl infektionsbedingter Todesfälle abgebrochen werden mussten. Der Einsatz als Erstlinientherapie bei Patient:innen mit CLL und nachgewiesener 17p-Deletion oder einer TP53-Mutation wird seither nicht mehr empfohlen. Zudem wurden verschiedene Maßnahmen zur Risikominimierung während der Idelalisib-Therapie festgelegt, u.a. die prophylaktische Behandlung gegen eine *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie (PJP) während der gesamten Dauer der Behandlung, regelmäßige klinische und laborchemische Untersuchungen auf das Vorliegen einer CMV-Infektion sowie die Bestimmung der absoluten Neutrophilenzahl (ANZ) mindestens alle zwei Wochen in den ersten sechs Monaten der Idelalisib-Therapie (Gilead Sciences GmbH, 2016).

Eine Beeinträchtigung der T-Zell-vermittelten Immunität durch direkte Auswirkungen von Idelalisib auf die T-Zell-Migration und Zytokinproduktion wurde bereits als Nebenwirkung beschrieben (Martinelli et al., 2018). Allerdings ist die T-Zell-vermittelte Immunität und die Einleitung einer suffizienten Immunantwort nicht nur von T-Zellen selbst abhängig, sondern auch von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Die potentesten dieser APC sind die Dendritischen Zellen (DC); sie präsentieren spezifische Antigene in Anwesenheit ko-stimulatorischer Moleküle und induzieren auf diese Weise CD8-positive zytotoxische T-Zellen (T<sub>C</sub>-Zellen) (Carbone et al., 1998). Bis dato lagen keine Untersuchungen zum Einfluss einer potenziellen Modulation von DC durch Idelalisib vor. In dieser Arbeit untersuchten wir daher den Effekt von Idelalisib auf Phänotyp und Funktion dendritischer Zellen, die Voraussetzung für eine adäquate Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der T-Zellen sind. Insbesondere wird herausgestellt, wie die PI3K $\delta$ -Inhibition nicht nur direkt die Funktion der T-Zellen reduziert, sondern auch die Antigen-spezifische T-Zell-Antwort durch Abschwächung der DC-Funktion beeinflusst.

## **1.2 Material und Methoden**

### **1.2.1 Proben**

Humane periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) wurden aus Buffy Coats von freiwilligen, gesunden Blutspendern der Universitätsklinik Bonn mittels Ficoll-Dichte-zentrifugation (Heine, 2006) isoliert. Die Studie wurde seitens der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt (#173/09) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

### **1.2.2 Medien und Reagenzien**

Idelalisib wurde von Selleckchem bezogen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das Glutamax-I enthält; zudem wurden 10%iges inaktiviertes fetales Kalbsserum (RP10 Medium) sowie 1%iges Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) zugesetzt. Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle Reagenzien über Sigma-Aldrich bezogen.



### 1.2.3 Generierung dendritischer Zellen

Aus den gewonnenen PBMNC wurden mittels Plastikadhärenz monozytäre DC generiert, wie in vorherigen Arbeiten beschrieben (Heine et al., 2013). Die adhärennten Monozyten wurden mit RP10 Medium für insgesamt sieben Tage inkubiert, an den Tagen 0, 2, 4 und 6 erfolgte die Zugabe der Zytokine GM-CSF (100 ng/ml, Leukine, Liquid Sargramostim) und IL-4 (20 ng/ml, R&D Systems) zur Differenzierung der monozytären in dendritische Zellen.

### 1.2.4 Immunfärbungen

Zur Immunfärbung der generierten DC wurden Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper der Anbieter BD Biosciences, DakoDiagnostika, Immunotech, RD Systems und eBioscience benutzt. Die Auswertung erfolgte via Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence-activated cell sorter).

### 1.2.5 Färbung von Kern und Zytoskelett

Zur Anfärbung der Zellkerne der DC wurde die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, bezogen von Carl Roth) markiert, der sich insbesondere an AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA anlagert. Zur Darstellung des Zytoskeletts wurde Phalloidin (bezogen von Sigma-Aldrich) verwendet, das spezifisch an filamentöses Aktin bindet und wiederum an einen grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Die auf diese Weise gefärbten DC wurden im Anschluss mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes visualisiert.

### 1.2.6 Messung der Zytokin-Produktion

Zur Messung der Zytokin-Produktion wurde das eBioscience™ ProcartaPlex Human Th1/Th2 Zytokin-Panel (11-plex, Thermofisher) entsprechend der Herstellervorgaben eingesetzt.

### 1.2.7 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

$1 \times 10^5$  allogene PBMNC wurden mit vorbehandelten Stimulator-moDC ko-kultiviert. Am fünften Tag wurde [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (18,5 kBq/well; GE Healthcare) zugegeben und für weitere 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Einbau des Tritium-markierten

Thymidin gemessen. Für die *inverse* MLR wurden allogene PBMNC mit Idelalisib vorbehandelt und mit unbehandelten DC für fünf Tage ko-inkubiert.

#### 1.2.8 Bestimmung der Apoptoserate

Um die Apoptoserate zu ermitteln, wurden die DC einer Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumiodid (PI) unterzogen, im Anschluss wurde die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 1.2.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

Der genaue Versuchsaufbau des Western Blots wurde bereits in vorherigen Arbeiten erläutert und soll hier nur in Kürze dargestellt werden (Koerber et al., 2015): Aus den geernteten Zellen wurden zunächst Lysate hergestellt und deren Proteinkonzentrationen mithilfe eines Bicinchoninsäure-Verfahrens ermittelt (Pierce, Perbio Science, Bonn, Deutschland). Jeweils 20 µg dieser Zelllysate wurden im Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Markierung der Proteine wurden monoklonale Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA) eingesetzt. Zur Darstellung der Proteinbanden wurde ein verstärktes Chemilumineszenz Kit verwendet (GE Healthcare).

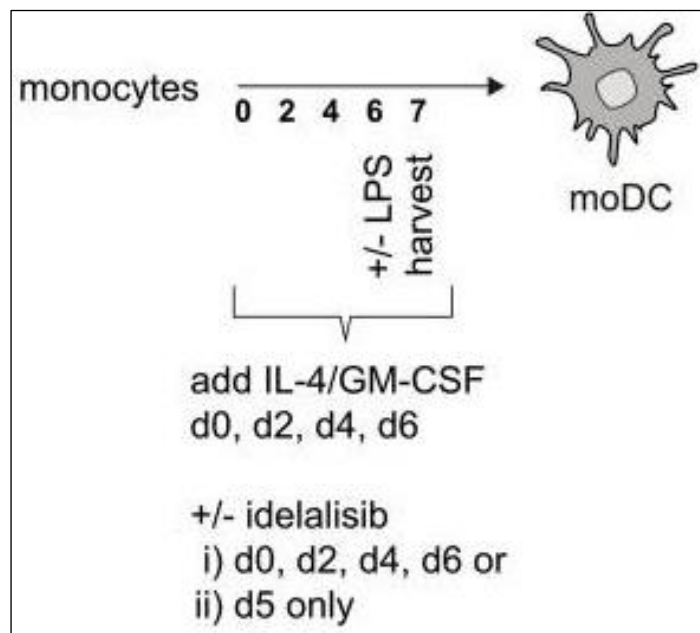
#### 1.2.10 Statistische Analyse

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt, hier werden repräsentative Experimente gezeigt. Per Kolmogorov-Smirnov bzw. Shapiro-Wilk-Test wurde eine Normalverteilung der Daten getestet. Die statistische Signifikanz der normalverteilten Daten wurde mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way Analysis of Variance – ANOVA) und dem Dunnett-Test unter Verwendung der Prism 8.4.3 Software (Graphpad Software) berechnet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt, sprich Ergebnisse des statistischen Signifikanztestes (p-Wert)  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Die jeweiligen p-Werte werden in den Legenden der Abbildungen angegeben. Dargestellt sind der Mittelwert, sowie der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error mean*).

### 1.3 Ergebnisse

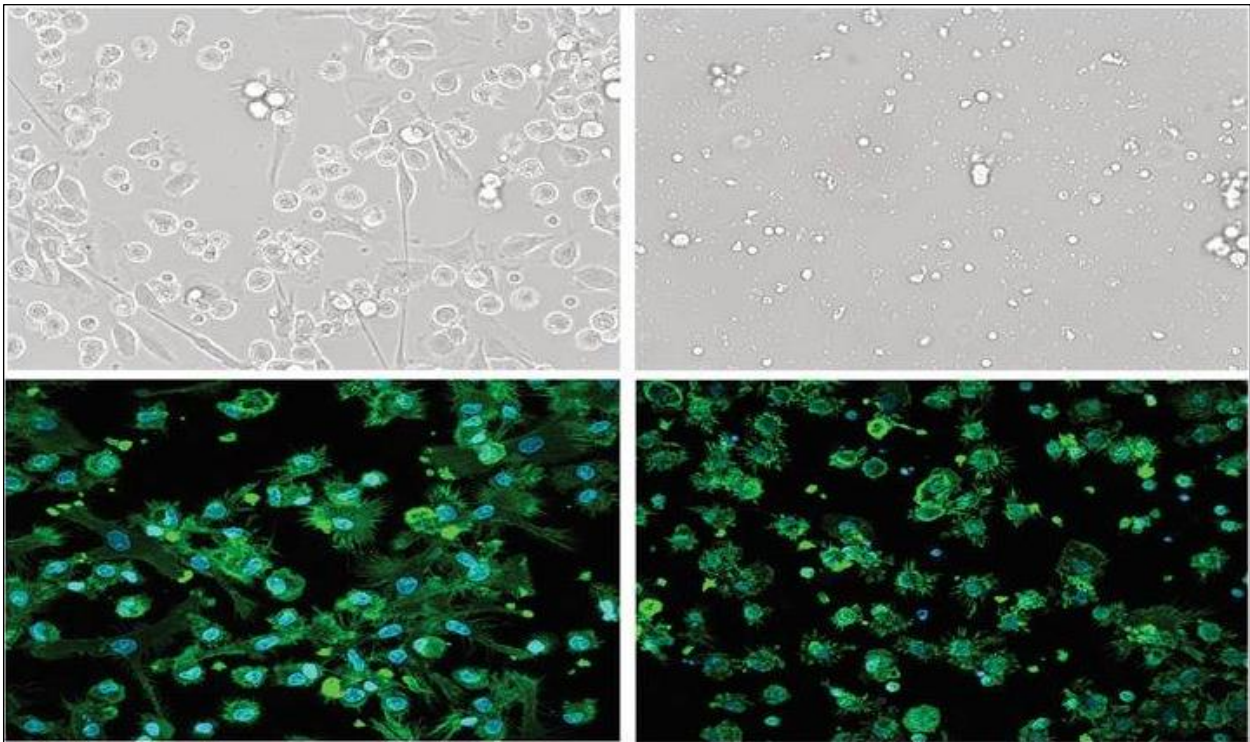
#### 1.3.1 Modulation der Differenzierung und der LPS-induzierten Reifung

Um die dosisabhängigen Effekte des PI3K $\delta$ -Inhibitors Idelalisib auf Zelldifferenzierung und Expression der Aktivierungsmarker der DC zu verstehen, differenzierten wir Monozyten zu monozytären DC in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 (Zugabe an Tag 0, 2, 4 und 6). Die Zugabe von Idelalisib bzw. DMSO erfolgte ebenfalls ab Tag 0 jeden zweiten Tag. Wurden reife DC benötigt, wurde die finale Reifung am 6. Tag durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Die Zellernte und –analyse erfolgte an Tag 7 (Abb. 2). Die eingesetzten Idelalisib-Konzentrationen korrelierten hierbei mit den in Patient:innen-Seren gemessenen Konzentrationen.



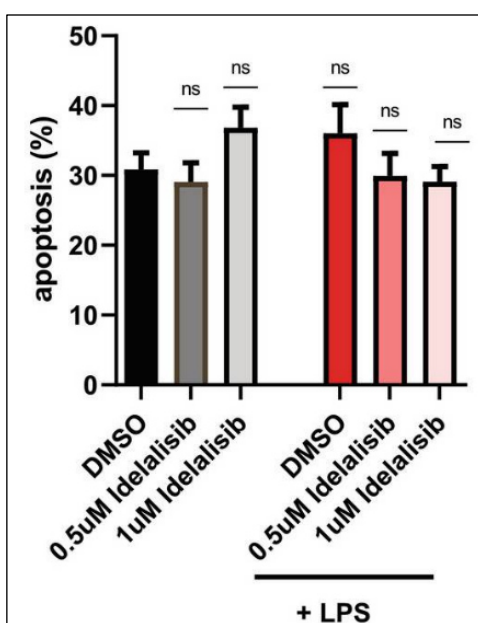
**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Generierung von DC (Braun et al., 2021)

In einem ersten Schritt untersuchten wir den Effekt von Idelalisib auf die Morphologie der DC, hierzu mikroskopierten wir die generierten DC sowohl im ungefärbten als auch im Phalloidin/DAPI-gefärbten Zustand. In Abbildung 3 sind repräsentative Bilder unbehandelter DC im Vergleich zu mit Idelalisib vorbehandelten DC dargestellt. Wir beobachteten eine beeinträchtigte Bildung dendritischer Verästelungen durch Zugabe von Idelalisib; die generierten Zellen ähnelten eher Monozyten als DC.



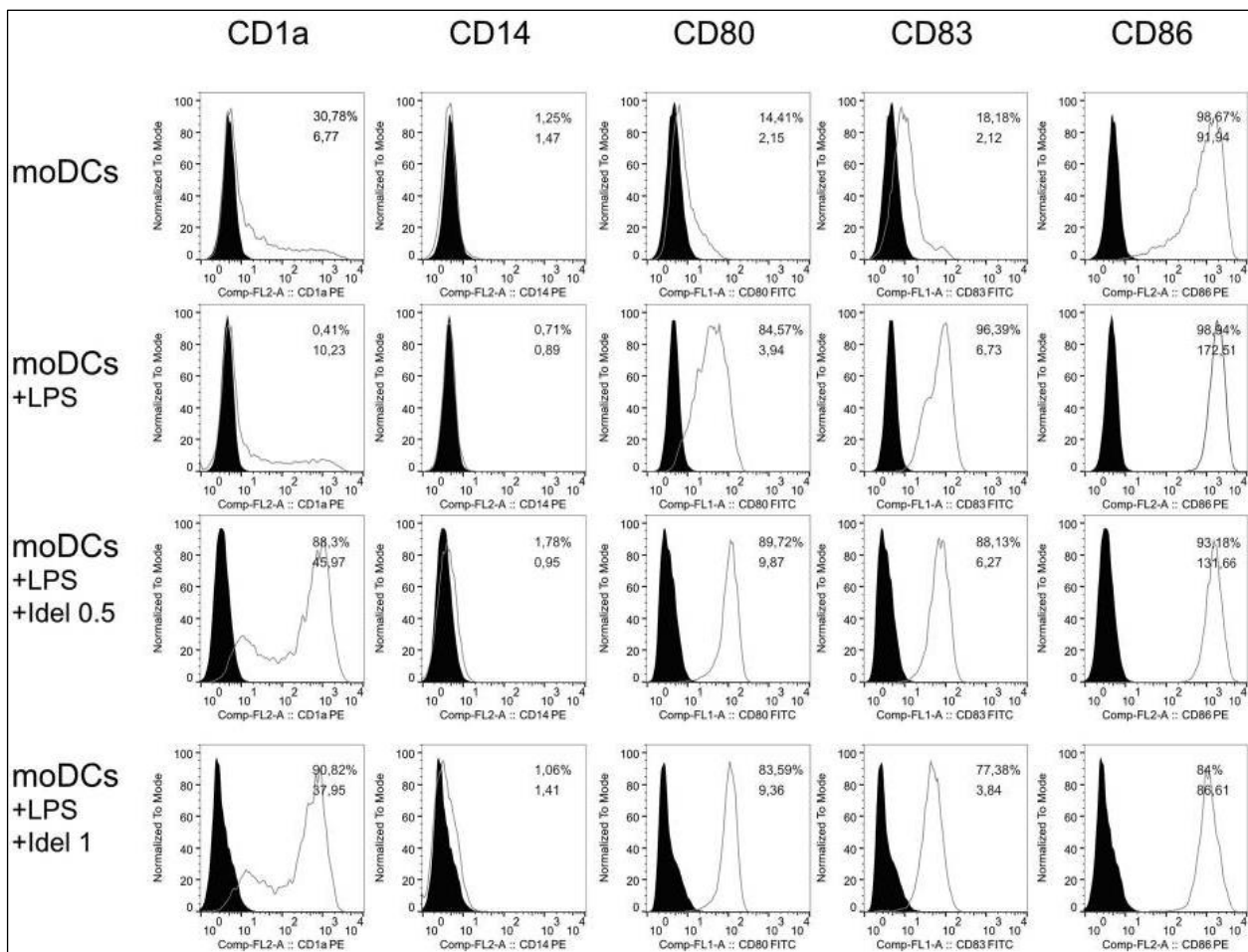
**Abb. 3:** Repräsentative Bilder unbehandelter (linke Spalte) vs. mit Idelalisib vorbehandelter (rechte Spalte) DC im ungefärbten Zustand (obere Zeile) bzw. nach DAPI/Phalloidin-Färbung (untere Zeile) (Braun et al, 2021)

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob die Zugabe von Idelalisib zu einer erhöhten Apoptoserate der DC führt, konnten aber bei den *in vitro* eingesetzten Dosierungen keinen signifikanten toxischen Effekt ausmachen (Abb. 4).

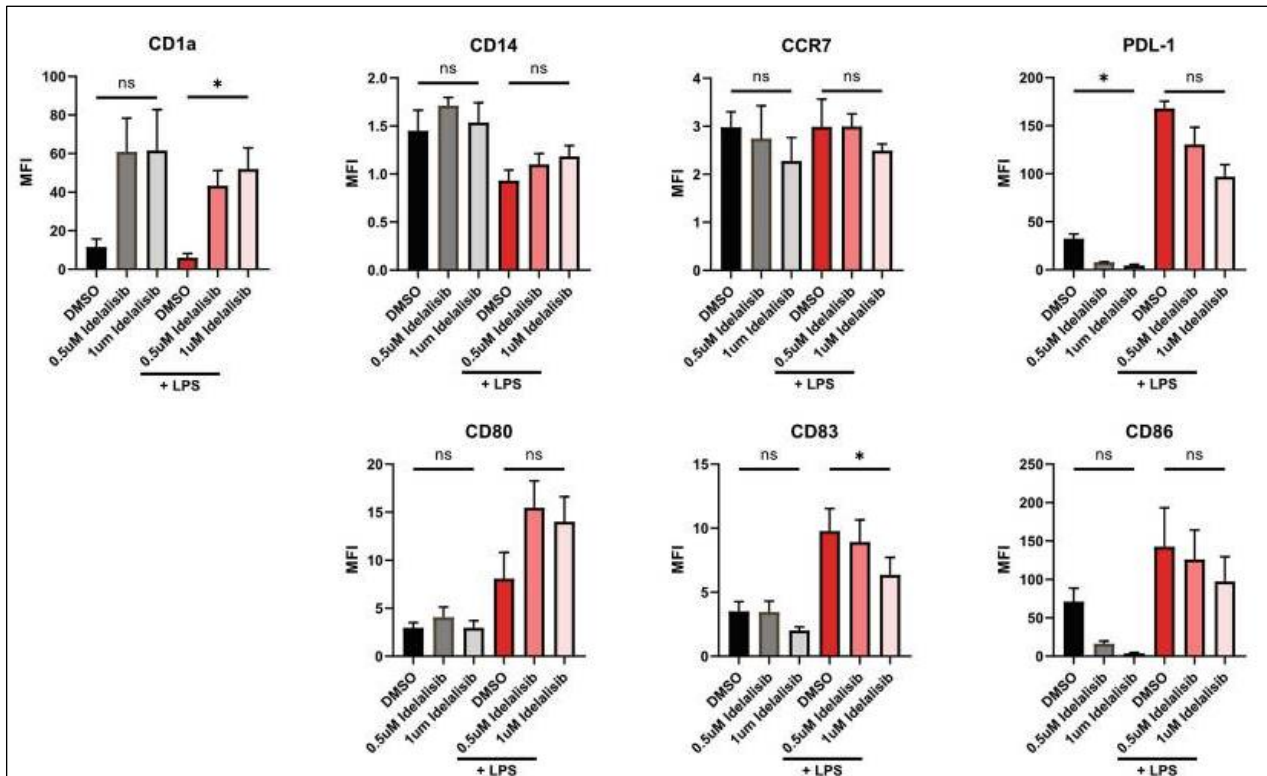


**Abb. 4:** Apoptose-Rate in % nach PI-Färbung.  
ns = nicht signifikant  
(Braun et al., 2021)

Mittels FACS-Analyse wurde die Expression verschiedener, für DC charakteristischer Oberflächenantigene untersucht. Die Expression des Monozyten-Markers CD14 blieb durch Behandlung mit Idelalisib unbeeinflusst, wohingegen bei reifen DC die Expression von CD1a, einem für die Präsentation von Lipid- und Glycolipid-Antigenen relevanten Oberflächenprotein, durch Idelalisib-Behandlung in Abhängigkeit von der Dosierung signifikant hochreguliert wurde. LPS-gereifte und mit Idelalisib behandelte DC zeigten eine signifikant reduzierte CD83-Expression im Vergleich zu DMSO-ausgesetzten Monozyten. Andere Aktivierungsmarker wie bspw. CD86 und CD80, wurden durch Idelalisib-Gabe nicht beeinflusst. Die Hemmung der PI3K $\delta$  resultierte außerdem in einer Herabregulation von PD-L1 auf unreifen DC, während die CCR7-Expression unbeeinflusst blieb. Nach LPS-induzierter Reifung der DC war die Veränderung der PD-L1-Expression allerdings statistisch nicht relevant (Abb. 5 und 6).



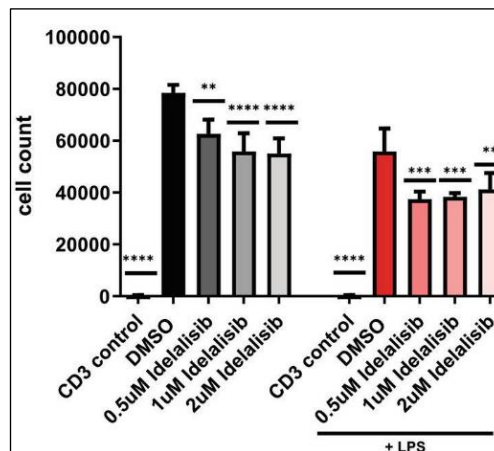
**Abb. 5:** Darstellung der Mean fluorescent intensity (MFI) der jeweiligen Oberflächen-Moleküle eines repräsentativen Versuchs (Braun et al., 2021).



**Abb.6:** Die MFI der jeweiligen Oberflächen-Moleküle dreier repräsentativer Versuche wurden gepoolt und hier graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde mithilfe des Dunnett-Mehrfachvergleichstestes (einfaktorielle Varianzanalyse) berechnet und bezieht sich auf die Isotyp-Kontrolle. ns = nicht signifikant, \* $p < 0,05$  (Braun et al., 2021)

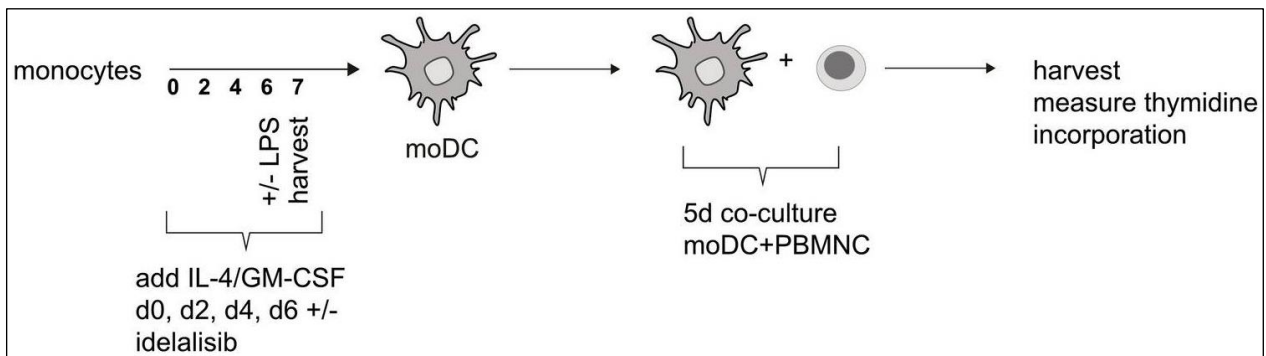
### 1.3.2 Reduktion der allogenen T-Zell-Aktivierung durch monozytäre DC

Weiterhin interessierte uns, auf welchem Wege Idelalisib die Interaktion zwischen DC und T-Zellen verändert. So konnten wir in einer ‚inversen‘ gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) zeigen, dass mit Idelalisib behandelte T-Zellen eine reduzierte Proliferation zeigten, wenn sie gemeinsam mit allogenen (unbehandelten) DC inkubiert wurden (Abb. 7).

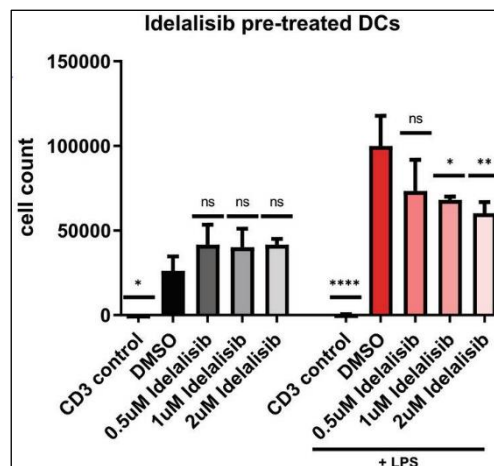


**Abb.7:** Reduzierte T-Zell-Proliferation in der *inversen* gemischten Lymphozytenreaktion (MLR). ns = nicht signifikant, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Braun et al., 2021)

Um die Fähigkeit mit Idelalisib vorbehandelter DC zur Orchestrierung der alloge­nen T-Zellen beurteilen zu können, ko-inkubierten wir vorbehandelte DC gemeinsam mit unbehandelten T-Zellen (Abb. 8). Diese MLR zeigte eine eingeschränkte Induktion der T-Zell-Proliferation durch mit Idelalisib vorbehandelte DC *in vitro* (Abb. 9). Somit konnte gezeigt werden, dass Idelalisib sowohl T-Zellen als auch DC beeinflusst, indem es ihre Fähigkeit allogene T-Zell-Antworten zu induzieren, herabsetzt und negativen Einfluss auf die angeborene Immunreaktion ausübt.



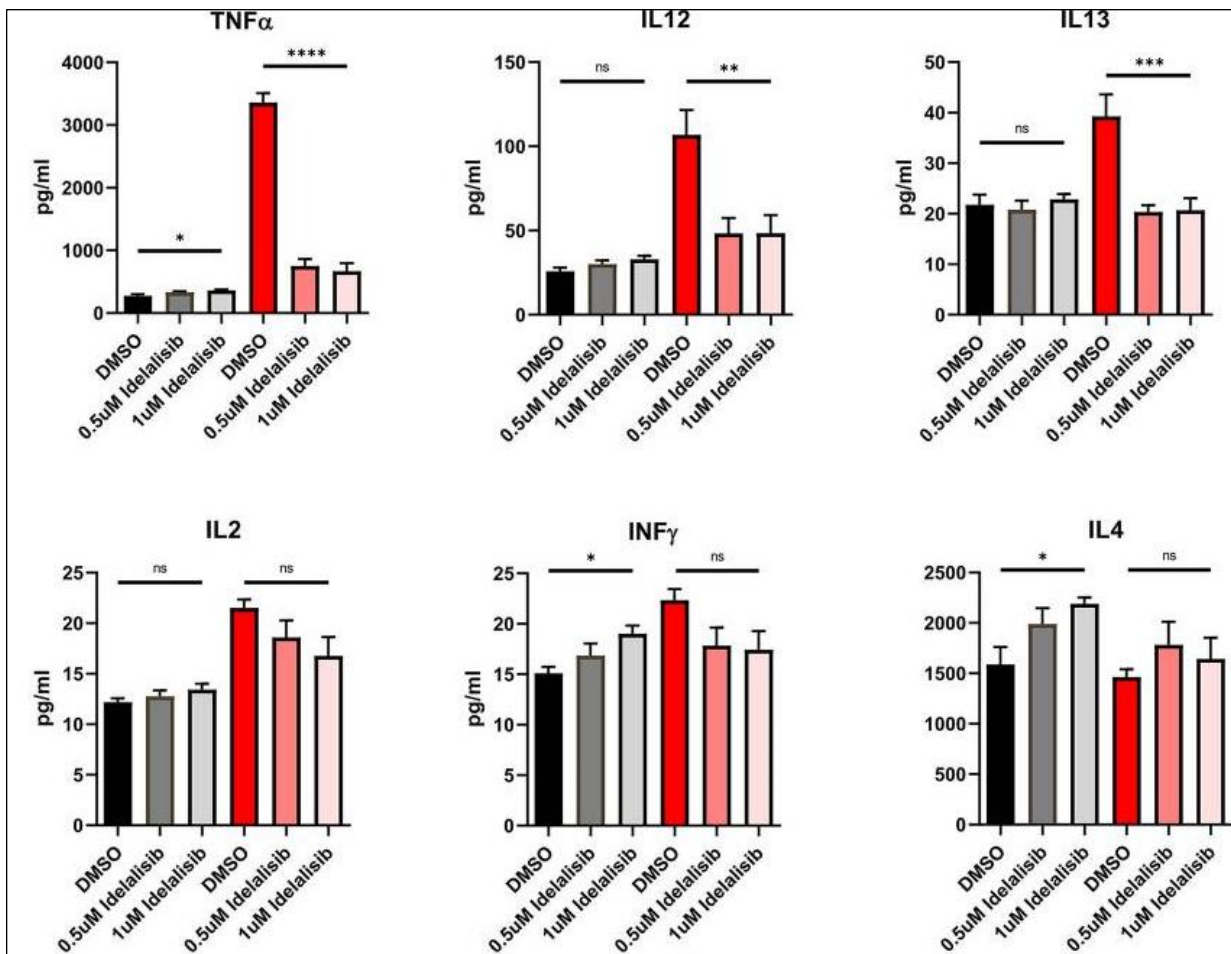
**Abb. 8:** Schematischer Versuchsaufbau der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) (Braun et al., 2021)



**Abb. 9:** Reduzierte T-Zell-Proliferation in der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 (Braun et al., 2021)

### 1.3.3 Idelalisib verändert die Zytokinsekretion LPS-gereifter DC

Neben ko-stimulierenden Signalen und Antigen-Präsentation beeinflussen DC die Einleitung einer Immunantwort auch durch ihre Zytokinsekretion. Aus diesem Grund analysierten wir die Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine durch DC nach vorangegangener Idelalisib-Behandlung und LPS-Stimulation. Die von DC produzierten Interleukine IL-12 und IL-2 sind für die Aktivierung der T-Zellen verantwortlich. Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), IL-4 und IL-13 leiten die T-Zell-Polarisierung ein bzw. erhalten diese aufrecht. Des Weiteren wurde die Konzentration von TNF $\alpha$  als T-Zell-Effektor-Molekül analysiert. Bei mit Idelalisib behandelten DC fanden wir signifikant verminderte Konzentrationen der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-13 und IL-12 im Vergleich zur Sekretion durch unbehandelte DC, die Konzentrationen von IL-2 und INF- $\gamma$  verblieben hingegen unverändert. Die IL-4-Sekretion durch unreife DC zeigte sich nach Idelalisib-Behandlung sogar deutlich erhöht; dieser Effekt wurde allerdings bei reifen DC aufgehoben (Abb. 10).



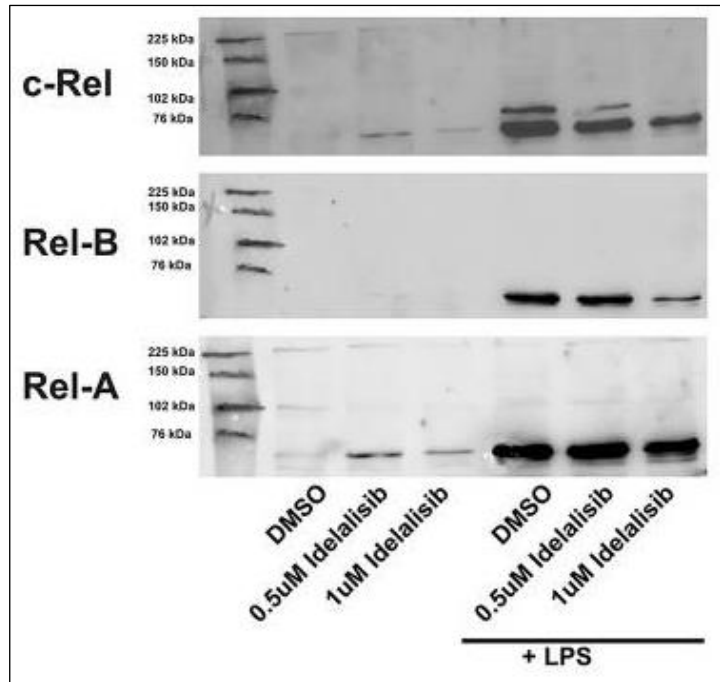
**Abb. 10:** Einfluss von Idelalisib auf die Zytokinsekretion LPS-gereifter DC.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Braun et al., 2021)

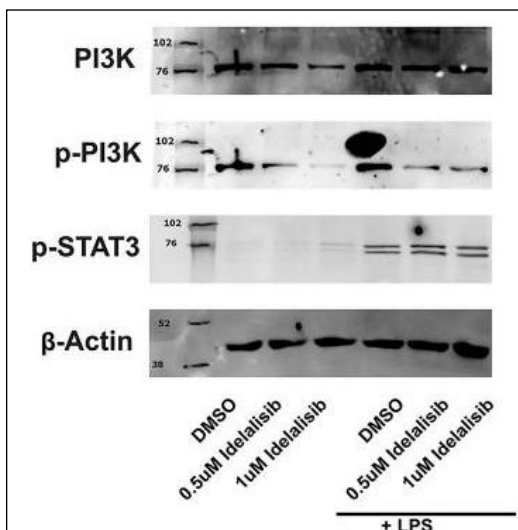


### 1.3.4 Idelalisib hemmt den NF $\kappa$ B-Signalweg

Angesichts der signifikanten Herunterregulation der für die T-Zell-Proliferation und -Funktion verantwortlichen Zytokine, stellten wir uns die Frage, welche Auswirkungen dies auf den NF $\kappa$ B-Signalweg, der dem PI3K/AKT-Signalweg nachgeschaltet ist, hat. Zu diesem Zweck analysierten wir die Proteinexpression der zum NF $\kappa$ B-Proteinkomplex gehörenden Rel-Proteine Rel-A, Rel-B und c-Rel mittels Western Blot. Repräsentative Western Blots in Abb. 11 zeigen, dass die beiden Proteine Rel-B und c-Rel durch Zugabe von LPS zu monozytären DC hochreguliert werden, dieser Effekt aber durch Vorbehandlung mit Idelalisib dosisabhängig reduziert wurde. Die Expression von Rel-A blieb auch nach Idelalisib-Zugabe unverändert und diente als Ladekontrolle



**Abb. 11:** Reduzierte Expression von c-Rel und Rel-B nach Vorbehandlung mit Idelalisib und LPS-Reifung (Braun et al., 2021)



**Abb. 12:** Die endogene PI3K-Expression sowie die Expression von p-STAT3 werden durch Idelalisib nicht verändert (Braun et al., 2021)

In einem weiteren Versuchsaufbau konnten wir zeigen, dass weder die endogene PI3K-Expression noch die Expression von p-STAT3 durch Behandlung mit Idelalisib verändert wurde. Wie erwartet, wurde die Phosphorylierung der PI3K durch Idelalisib gehemmt. Durch die  $\beta$ -Aktin-Expression wird der Einsatz identischer Proteinmengen in den Versuchsreihen bestätigt (Abb. 12).

## 1.4 Diskussion

### 1.4.1 Therapielimitierungen bei Einsatz von Idelalisib

In den vergangenen Jahren unterlag die Therapie der B-Zell-Lymphome angesichts der Entwicklung neuartiger Medikamente einem starken Wandel: von der klassischen Chemotherapie über die Immuntherapie hin zur zielgerichteten Therapie („targeted therapy“). Als vielversprechender Kandidat unter den „small molecules“ der zielgerichteten Therapien erhielt der PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib (Zydelig®) im September 2014 die Zulassung seitens der EMA zur Behandlung der B-Non-Hodgkin-Lymphome CLL und FL. Allerdings beobachtete man unter Therapie mit Idelalisib sowohl ernsthafte unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Transaminasenerhöhungen, Colitis und Diarrhoen als auch lebensbedrohliche Infektionen, die zu Therapielimitierungen führten (Furman et al., 2014; de Weerd et al., 2017).

Im März 2016 erschien schließlich ein Rote-Hand-Brief zu Idelalisib, der die Anwendung von Idelalisib einschränkte und Maßnahmen zur Risikominimierung während der Idelalisibtherapie, wie etwa regelmäßige klinische und virologische Screenings auf das Vorliegen einer CMV-Infektion sowie *Pneumocystis jirovecii*-Prophylaxen für die Dauer der Idelalisib-Therapie vorschrieb. Der Einsatz von Idelalisib erfolgt im klinischen Alltag seither nur noch zurückhaltend, es kommen vermehrt alternative neue Substanzen wie etwa der 2016 von der EMA zugelassene BCL2-Inhibitor Venetoclax oder die Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Ibrutinib) zum Einsatz.

### 1.4.2 Einfluss von Idelalisib auf das Immunsystem

Welche Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung von Idelalisib zugrunde liegen, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Martinelli et al. (2018) konnten zeigen, dass eine Therapie mit Idelalisib die T-Zell-vermittelte Immunität einschränkt. Um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss Idelalisib auf dendritische Zellen nimmt, generierten wir DC aus PBMNC unter Zugabe von Idelalisib und unterzogen diese vorbehandelten Zellen verschiedenen Experimenten, um Veränderungen ihres Phänotyps und ihrer Funktion zu detektieren.

Unsere Untersuchungen zeigen nun, dass die Inhibition der PI3K $\delta$  nicht nur Einfluss auf T-Zellen und maligne B-Zellen ausübt, sondern auch die Differenzierung und Funktion der DC durch die *In-vitro*-Behandlung mit Idelalisib stark modifiziert wird.

Die Zugabe von Idelalisib während der Generierung monozytärer DC aus Monozyten führte zu einer defizitären Differenzierung sowie einem veränderten Phänotyp der DC. So war beispielsweise die Expression von CD83, einem Oberflächenprotein, das reife DC exprimieren und das stärkste ko-stimulierende Molekül in der Einleitung einer allogenen T-Zell-Proliferation darstellt, nach LPS-Aktivierung und Idelalisib-Behandlung der DC deutlich verringert (Zhou und Tedder, 1995). Diese verminderte Expression von CD83 könnte sowohl den unreif imponierenden Phänotyp als auch das Unvermögen der DC, eine adäquate T-Zell-Proliferation auszulösen, erklären. Bereits die alleinige Herunterregulation von CD83 auf DC zieht eine Störung der T-Zell-Antwort nach sich, selbst wenn die Expression weiterer ko-stimulierender Moleküle ungestört ist, wie schon Aerts-Toegaert et al. (2007) zeigen konnten.

Die Beeinträchtigung der DC-Funktion wird außerdem anhand der verringerten Zytokinsekretion deutlich: nach LPS-Aktivierung zeigten sich bei mit Idelalisib behandelten DC deutlich geringere Konzentrationen an IL-13, IL-12 und TNF $\alpha$ .

Während einer CMV-Infektion konnten erhöhte Spiegel der von T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Zytokine gemessen werden, die für die Elimination des CMV-Virus unerlässlich sind (Essa et al., 2009). Die Differenzierung der T<sub>H</sub>2-Zellen wird durch IL-4 eingeleitet, dessen Expression durch Idelalisib-Behandlung nicht herabgesetzt wird (Junttila, 2018). Für das Überleben und den Erhalt der Funktionalität der T<sub>H</sub>2-Zellen ist hingegen IL-13 verantwortlich (Bellinghausen et al., 2003.; Yang et al., 2013). Eine verringerte IL-13 Sekretion führt folglich zu einer verminderten Zytokinproduktion durch T-Helfer-2-Zellen und könnte somit CMV-Infektionen begünstigen.

IL-12 spielt eine zentrale Rolle in der Induktion der T-Zell-Antwort (Trinchieri, 2003). Seine Freisetzung ist daher Voraussetzung, um eine CMV-Primärinfektion mithilfe CD4-positiver T-Zellen kontrollieren zu können (Popescu et al., 2016). So könnte neben der Lymphozytopenie auch die verminderte Freisetzung von IL-12 und IL-13 durch unzureichend differenzierte DC mit Idelalisib behandelter Patient:innen zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber CMV-Infektionen beitragen.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass auch die direkte Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch Idelalisib zu einer Störung der Funktion und einem unreif wirkenden Phänotyp der DC führen könnte. In Übereinstimmung mit den von uns erhobenen Daten konnten bereits frühere Studien die Relevanz des NF $\kappa$ B-Signalweges für die Entwicklung dendritischer Zellen und die IL-12-Produktion unterstreichen (Ouaaz et al., 2002).

Eine weitere schwerwiegende Komplikation unter Idelalisib-Therapie stellt die *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie dar. Für die Elimination von *Pneumocystis jirovecii* ist das Zytokin TNF $\alpha$  von großer Bedeutung (Chen et al., 1992). Die von uns gemessenen verminderten TNF $\alpha$ -Spiegel nach Behandlung mit Idelalisib könnten zum erhöhten Risiko einer fatalen PJ-Pneumonie beitragen. Hier ist allerdings einschränkend zu berücksichtigen, dass wir nur den Effekt von Idelalisib auf DC, nicht aber auf Makrophagen untersuchten. Letztere stellen die wesentliche biologische Quelle für TNF $\alpha$  dar, die TNF $\alpha$ -Produktion durch DC macht nur einen geringen Anteil aus.

Das Unvermögen Idelalisib-vorbehandelter DC nach infektiöser Provokation eine robuste Immunantwort einzuleiten, resultiert zudem aus der Tatsache, dass eine adäquate Stimulation der T-Zellproliferation durch DC nach Zugabe von Idelalisib nicht mehr gewährleistet ist. DC aktivieren naive T-Zellen über drei Signale: Antigen-Präsentation (Signal 1), Ko-Stimulation (Signal 2) und Zytokin-Produktion (Signal 3) (Granucci et al., 2013). Zwar war die Antigen-Präsentation nicht Bestandteil unserer Untersuchungen, hinsichtlich der Ko-Stimulation und der Zytokin-Produktion konnten wir aber zeigen, dass beide Signale durch Behandlung der DC mit Idelalisib verändert wurden. Unsere Ergebnisse in Bezug auf die eingeschränkte T-Zell-Proliferation in der MLR kongruieren hiermit.

Die von uns gefundenen Einflüsse von Idelalisib auf verschiedene Aspekte des Immunsystems könnten helfen, die zugrundeliegenden Mechanismen der schwerwiegenden infektiösen Komplikationen unter Idelalisibtherapie, zu verstehen. Idelalisib verringert die Expression mindestens eines ko-stimulierenden Moleküls auf der DC-Oberfläche und, noch wichtiger, vermindert die Produktion verschiedener Zytokine durch DC *in vitro*. Für eine korrekte T-Zell-Differenzierung und Polarisierung sind ebendiese Zytokine aber essenziell. Klinische Infektionen mit CMV oder PJ könnten daher nicht nur Folge fehlerhafter T-Zell-Antworten, sondern auch durch insuffiziente T-Zell-Polarisierung infolge verminderter Zytokinsekretion begründet sein. Zwar wurden unsere

Daten *in vitro* erhoben, klinische Beobachtungen implizieren aber die Relevanz unserer Ergebnisse *in vivo*.

#### 1.4.3 Neue Einsatzgebiete der PI3K $\delta$ -Inhibitoren

Während die schwerwiegenden infektiösen Komplikationen den Einsatz von Idelalisib zur Behandlung der B-Zell-Lymphome limitieren, könnte die Suppression der T-Zellen und DC auch neue Einsatzgebiete für PI3K $\delta$ -Inhibitoren eröffnen, etwa für myeloproliferative Neoplasien (MPN), die durch chronische Entzündungsreaktionen begünstigt werden (Hasselbalch und Bjørn, 2015). So läuft seit 2017 eine klinische Studie zum Einsatz einer Kombination aus dem PI3K $\delta$ -Inhibitor Parsaclisib mit dem JAK-Inhibitor Ruxolitinib bei Myelofibrosepate:innen, die vielversprechende Zwischenergebnisse lieferte (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02718300). Die Ergebnisse werden bislang auf die direkten Effekte der PI3K $\delta$ -Inhibitoren auf die malignen Zellen zurückgeführt (Bartalucci et al., 2017). In Anbetracht der von uns erzielten Ergebnisse ist aber davon auszugehen, dass auch die Auswirkungen des PI3K $\delta$ -Inhibitors auf die DC hierfür mitursächlich sind.

## 1.5 Zusammenfassung

Der PI3K $\delta$ -Inhibitor Idelalisib wurde 2014 zur Behandlung der Non-Hodgkin-Lymphome FL und CLL zugelassen. Aufgrund von gravierenden Infektionskomplikationen mit Cytomegalievirus und *Pneumocystis jirovecii* ist der Einsatz von Idelalisib in den vergangenen Jahren jedoch deutlich zurückgegangen; im Jahr 2016 erschien ein „Rote-Hand-Brief“ mit Einschränkungen der Anwendungsgebiete aufgrund des erhöhten Infektionsrisikos. Unser Ziel war es, den Einfluss von Idelalisib auf humane Dendritische Zellen (DC) als wichtige Vermittler in der Einleitung der zellulären Immunantwort zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass die Behandlung von aus Monozyten generierten DC mit Idelalisib zu einem unreif imponierenden Phänotyp führt. Darüber hinaus konnten mit Idelalisib behandelte DC nach Aktivierung mit dem TLR-9-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) in geringerem Maß ko-stimulatorische Moleküle, insbesondere CD83, hochregulieren als solche, die lediglich mit der Trägersubstanz behandelt worden waren. Passend hierzu zeigte sich in Abhängigkeit von der angewendeten Dosis ein zunehmendes Unvermögen der mit Idelalisib behandelten DC, eine suffiziente Proliferation und Differenzierung allogener T-Zellen auszulösen. Schließlich zeigte sich auch die Aktivierung des Nf $\kappa$ B-Signalweges bei Idelalisib-behandelten DC vermindert. Die Inhibition der PI3K $\delta$  während der Zelldifferenzierung der DC führte darüber hinaus zu einer reduzierten Sekretion der Zytokine Interleukin-12, Interleukin-13 und TNF $\alpha$  nach LPS-Stimulation. Diese sind für die Elimination von Infektionserregern wie CMV und PJ von großer Relevanz. In Zusammenschau dieser Befunde führte die Behandlung der DC mit Idelalisib somit nicht nur zu einer defizitären DC, sondern auch zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung. Unsere Ergebnisse deuten entsprechend darauf hin, dass schwere Infektionskomplikationen nicht nur auf die direkte PI3K $\delta$ -Inhibition in T-Zellen, sondern auch auf eine gestörte Funktion der DC bei mit Idelalisib therapierten Patient:innen zurückzuführen sein könnten. Unsere Arbeit liefert neue Einblicke in die Pathogenese Idelalisib-assoziiierter Infektionskomplikationen und könnte Grundlagen für neuartige Therapieoptionen etwa für myeloproliferative Neoplasien mit Idelalisib liefern.

### 1.6. Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.*2007; 37: 686–695

Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet* 2017; 390: 298–310

Bartalucci N, Calabresi L, Balliu M, Martinelli S, Rossi MC, Villeval JL, Annunziato F, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Inhibitors of the PI3K/mTOR pathway prevent STAT5 phosphorylation in JAK2V617F mutated cells through PP2A/CIP2 Axis. *Oncotarget* 2017; 8: 96710–96724

Bellinghausen I, Brand P, Böttcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003; 108: 167–176

Braun C, Schlaweck S, Daecke SN, Brossart P, Heine A. The PI3K $\delta$  inhibitor Idelalisib impairs the function of human dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2021; 70: 3693–3700

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)/Gilead Sciences GmbH, 2016: Wichtige Information zu Zydelig - Einschränkungen für die Anwendung von Zydelig (Idelalisib) zur Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und des rezidierten follikulären Lymphoms (FL) aufgrund neuer Erkenntnisse aus klinischen Studien.

[https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2016/rhb-zydelig.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=1](https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2016/rhb-zydelig.pdf?__blob=publicationFile&v=1) (Zugriffsdatum 14.04.2022)

Carbone FR, Kurts C, Bennett SR, Miller JF, Heath WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 1998; 19: 368–373

Chen W, Havell EA, Harmsen AG. Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 1279–1284

de Weerd I, Koopmans SM, Kater AP, van Gelder M. Incidence and management of toxicity associated with ibrutinib and idelalisib: a practical approach. *Haematologica* 2017; 102: 1629–1639

Essa S, Pacsa A, Raghupathy R, Said T, Nampoory MRN, Johny KV, Al-Nakib W. Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* 2009; 41: 1643–1647

European Medicines Agency (EMA). 2014: CHMP assessment report Zydelig (International non-proprietary name: Idelalisib). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zydelig-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zydelig-epar-public-assessment-report_en.pdf). 2014 (Zugriffsdatum: 14.04.2022)

Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 370: 997–1007

Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, Flinn IW, Flowers CR, Martin P, Viardot A, Blum KA, Goy AH, Davies AJ, Zinzani PL, Dreyling M, Johnson D, Miller LL, Holes L, Li D, Dansey RD, Godfrey WR, Salles GA. PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med.* 2014; 370: 1008–1018



Granucci F, Lutz MB, Zanoni I. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal 2. *Front Immunol.* 2013; 4:198

Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as inflammatory diseases: the evidence, consequences, and perspectives. *Mediators Inflamm.* 2015

Heine A. Dissertationsschrift aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen Abteilung Innere Medizin II. Induktion CMV-spezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen (2006)

Heine A, Held SAE, Daecke SN, Wallner S, Yajnanarayana SP, Kurts C, Wolf D, Brossart P. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood.* 2013; 122: 1192–1202

Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, Jones J, Andritsos L, Puri KD, Lannutti BJ, Giese NA, Zhang X, Wei L, Byrd JC, Johnson AJ. Phosphatidylinositol 3-kinase- $\delta$  inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood.* 2010; 116: 2078–2088

Junttila IS. Tuning the cytokine responses: an update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol.* 2018; 9: 888

Koerber R-M, Held SAE, Heine A, Kotthoff P, Daecke SN, Bringmann A, Brossart P. Analysis of the anti-proliferative and the pro-apoptotic efficacy of Syk inhibition in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol.* 2015; 4: 21

Martinelli S, Maffei R, Fiorcari S, Quadrelli C, Zucchini P, Benatti S, Potenza L, Luppi M, Marasca R. Idelalisib impairs T-cell-mediated immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2018; 103: e598–e601

Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF- $\kappa$ B subunits. *Immunity*. 2002; 16: 257–270

Popescu I, Pipeling MR, Mannem H, Shah PD, Orens JB, Connors M, Migueles SA, McDyer JF. Interleukin 12-dependent cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cell proliferation, T-bet induction and effector multi-function during primary infection are key determinants for early immune control. *J Immunol*. 2016; 196: 877–890

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 133–146

Yang L, Xu L-Z, Liu Z-Q, Yang G, Geng X-R, Mo L-H, Liu Z-G, Zheng P-Y, Yang P-C. Interleukin-13 interferes with activation-induced t-cell apoptosis by repressing p53 expression. *Cell Mol Immunol*. 2016; 13: 669–677

Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*. 1995; 154: 3821–3835

## 2. Veröffentlichung

Cancer Immunology, Immunotherapy (2021) 70:3693–3700  
<https://doi.org/10.1007/s00262-021-02988-3>

### RESEARCH REPORT



# The PI3K $\delta$ inhibitor idelalisib impairs the function of human dendritic cells

Christiane Braun<sup>1</sup> · Sebastian Schlaweck<sup>1,2</sup> · Solveig Nora Daecke<sup>1</sup> · Peter Brossart<sup>1</sup> · Annkristin Heine<sup>1</sup>

Received: 22 September 2020 / Accepted: 16 June 2021 / Published online: 25 June 2021  
 © The Author(s) 2021

### Abstract

The PI3K $\delta$ -inhibitor Idelalisib is approved for the treatment of Non-Hodgkin lymphoma. However, its use has been decreased within the last years due to deleterious infections such as cytomegalovirus and pneumocystis jirovecii. Here, we have investigated the effect of Idelalisib on human monocyte-derived dendritic cells (DCs) as important players in the induction of immune responses. We found that Idelalisib-treated DCs displayed impaired T cell stimulatory function. PI3K $\delta$  inhibition during differentiation resulted in decreased Interleukin-12, Interleukin-13 and TNF $\alpha$  production by DCs after lipopolysaccharide stimulation. Moreover, DCs showed decreased expression of the activation marker CD83 after Idelalisib treatment. Further, in line with this was the failure of Idelalisib-treated DCs to properly induce allogeneic T cells in a dose-dependent manner. Finally, activation of the NF $\kappa$ B pathway was also ablated in Idelalisib-treated DCs. Our results implicate that severe infectious complications may not only result from direct PI3K $\delta$ -inhibition in T cells, but also from impaired DC function in Idelalisib-treated patients. Here, we provide new insight into the pathogenesis of Idelalisib-associated infectious complications. Our study may further provide a rationale for the use of Idelalisib as a novel therapeutic option in inflammatory diseases.

**Keywords** Idelalisib · Infection · Dendritic cells · PI3K $\delta$

### Introduction

Non-Hodgkin lymphoma, like follicular lymphoma (FL) and small lymphocytic lymphoma/chronic lymphatic leukemia (SLL/CLL), are hematological malignancies characterized by uncontrolled proliferation of clonal B cells, which leads to painless lymphadenopathy in most cases. Any organ may be affected, which is reflected by the broad variety of clinical presentations of these diseases [1]. Treatment options for Non-Hodgkin lymphomas have evolved in the past decades

from classical chemotherapy to immunotherapy as well as targeted therapy. Among targeted therapies, PI3K $\delta$  has been identified as a potent target for B cell malignancies. PI3K $\delta$  is a tyrosine kinase predominantly expressed in leukocytes. It is located in the cytoplasm and activates the AKT/mTOR pathway [2]. Idelalisib, a specific small molecule inhibiting PI3K $\delta$ , showed remarkable clinical results for the treatment of FL as well as CLL [3, 4]. However, infection rates, for example of cytomegalovirus (CMV) and pneumocystis jirovecii (PJP) in patients treated with Idelalisib in combination with classical immune-chemotherapy, were significantly increased [5]. Impaired T cell-mediated immunity due to direct effects on T cell migration and cytokine production has already been described as a side effect of Idelalisib treatment [6].

T cell-mediated immunity and the induction of a potent immune response are not only T cell-dependent, but also require professional antigen-presenting cells (APCs). Dendritic cells (DCs) presenting a specific antigen and expressing appropriate co-stimulatory molecules are the most potent APCs. They can orchestrate immune responses of

Christiane Braun and Sebastian Schlaweck have contributed equally

✉ Annkristin Heine  
 Annkristin.Heine@ukbonn.de

<sup>1</sup> Medical Clinic III, Clinic for Oncology, Hematology, Immuno-Oncology and Rheumatology/Clinical Immunology, University Hospital Bonn, Venusberg Campus 1, 53127 Bonn, Germany

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Mildred Scheel School of Oncology Aachen Bonn Cologne Düsseldorf (MSSO ABCD), University Hospital of Bonn, 53127 Bonn, Germany

naïve CD8<sup>+</sup> T cells and subsequently induce cytotoxic T cell responses [7].

In this study, we investigated the effect of Idelalisib on DC function, which is a prerequisite for appropriate T cell activation, differentiation and proliferation. Our study may highlight how PI3K $\delta$  inhibition not only diminishes T cell function directly, but also affects antigen-specific T cell responses through attenuated DC function.

## Methods

### Samples

Human monocytes were isolated from buffy coats from voluntary blood donors at the University Hospital Bonn.

### Media and reagents

Idelalisib was purchased from Selleckchem. Cells were cultured in RPMI 1640 containing glutamax-I, supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (RP10 medium) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

### Generation of DCs

Plastic adherence of peripheral blood allowed the generation of human moDCs, as previously described [8]. These adherent cells were differentiated in RP10 medium. GM-CSF (100 ng/ml; Leukine, Liquid Sargramostim) and IL-4 (20 ng/ml; R&D Systems) were supplemented from the beginning every other day.

### Immunostaining

Fluorescence-labeled, monoclonal antibodies commercially available from BD Biosciences, DakoDiagnostika, Immunotech, R&D Systems and eBioscience were used for staining of generated DCs.

### Determination of cytokine production

Cytokine secretion was analyzed using the eBioscience™ ProcartaPlex Human Th1 /Th2 Zytokin-Panel (11-plex) (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions.

### Mixed lymphocyte reactions

$1 \times 10^5$  allogeneic peripheral blood mononuclear cells were co-cultured with pretreated and irradiated stimulator moDCs. On day 5, after a 16 h pulse with [<sup>3</sup>H]-thymidine

(18.5 kBq/well; GE Healthcare) Tritium-labeled thymidine incorporation was measured.

### Detection of apoptosis

Apoptosis in DCs was detected by live-dead staining using the propidium iodide or 7-aminoactinomycin D–annexin V staining kit from eBioscience.

### Polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting

Western blotting was performed as described before [9]. Briefly, whole cell lysates were generated, and protein concentration was measured using a bicinchoninic acid assay (Pierce, Perbio Science, Bonn, Germany). Whole cell lysates (20  $\mu$ g) were separated on a polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Monoclonal antibodies by Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA) were used. An enhanced chemiluminescence kit was used to detect protein bands (GE Healthcare).

### Statistical analysis

All experiments were performed at least 3 times, with representative experiments shown. Statistical significance was calculated with one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's using the Prism 8.4.3 software (Graphpad Software).

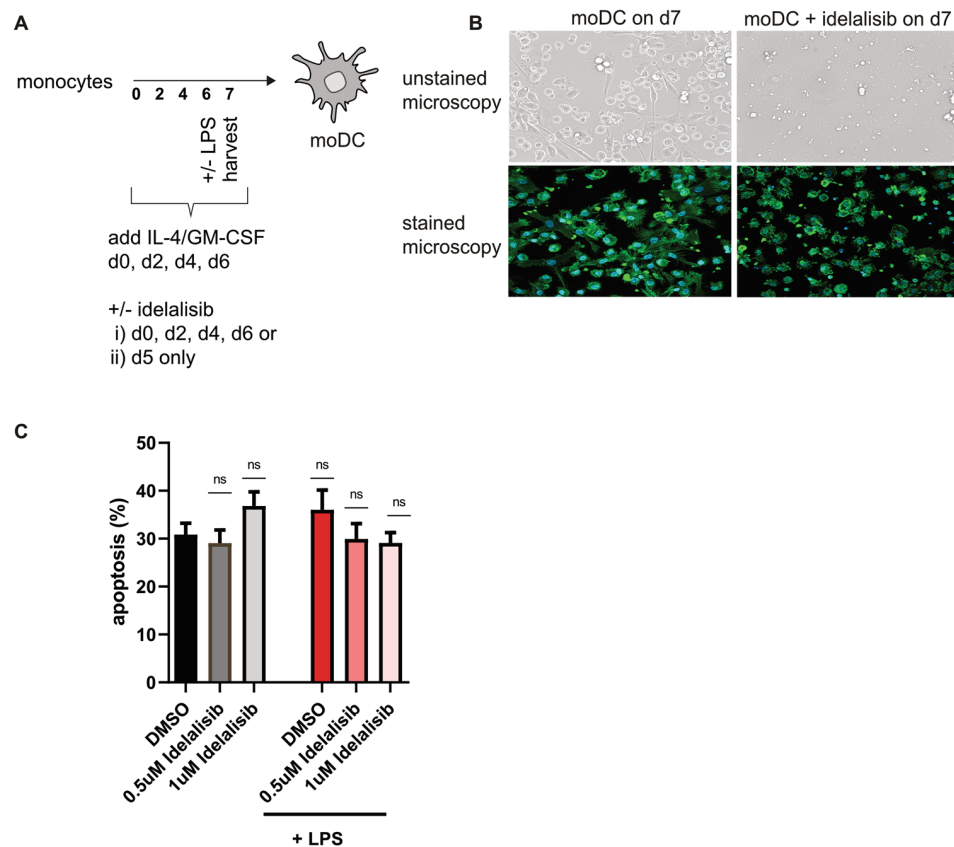
## Results

### Idelalisib modulates the differentiation of human monocytes into DCs and decreases LPS-induced maturation of moDCs

To understand dose-dependent effects of the PI3K $\delta$  inhibitor on lineage and activation markers, we differentiated monocytes into moDCs in the presence of GM-CSF and IL-4. Idelalisib applications were performed from day 0, on every other day, and final LPS maturation was induced on day 6 (Fig. 1A). Chosen concentrations of Idelalisib correlate with patient's sera concentrations.

As a first approach, we investigated the effect of Idelalisib on DC morphology and observed impaired formation of dendritic branches and trees. The generated cells resembled monocytes rather than DCs. (Fig. 1B). Next, we analyzed whether Idelalisib induces apoptosis in DCs, but did not detect any significant toxic effects on DCs in the concentrations used in vitro. (Fig. 1C). Expression of the monocyte marker CD14 was not affected by Idelalisib treatment and remained stable, whereas CD1a, a surface protein important

**Fig. 1** Idelalisib modulates the phenotype of moDCs without affecting cell viability **A** Schematic experimental design for the differentiation of moDCs. Human monocytes cultured under DC-driving conditions were exposed (+) every other day to different concentrations of Idelalisib (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M on day 0, 2, 4 and 6) or DMSO or (ii) only on day 5. When indicated, TLR stimulation was applied on day 6. Cells were analyzed on day 7. **B** Representative pictures of unstained and Phalloidin/DAPI-stained moDCs after Idelalisib pre-treatment are shown, **C** Apoptosis rate calculated after PI and Annexin V staining is shown. MoDCs were generated in the presence of Idelalisib. Idelalisib or DMSO was added every other day. (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M)



for the presentation of lipid and glycolipid antigens, was significantly upregulated by Idelalisib treatment after LPS maturation in a dose-dependent manner. LPS-matured DCs showed significantly reduced CD83 expression when compared to vehicle-exposed monocytes, while other activation markers such as CD86 and CD80, were not affected. PI3K $\delta$  blockade also resulted in downregulation of PD-L1 on immature moDCs, while CCR7 expression was not affected by Idelalisib. However, the effect on PD-L1 expression was not statistically significant after LPS maturation (Fig. 2A and B).

### Allogeneic T cell activation by human moDCs is dampened by Idelalisib treatment

We were further interested in how Idelalisib modulates the DC–T cell interaction. First, we were able to show that T cells treated with Idelalisib showed reduced proliferation when co-incubated with allogeneic moDCs. (Fig. 3B) To assess the capacity of moDCs to orchestrate allogeneic T cell proliferation, we co-incubated Idelalisib-pretreated moDCs and untreated T cells. This mixed lymphocyte reaction (MLR) showed impaired induction of allogeneic T cell proliferation by Idelalisib-pretreated moDCs in vitro (Fig. 3C).

Thus, Idelalisib affects both T cells and DCs as it reduces their capacity to induce allogeneic T cell responses.

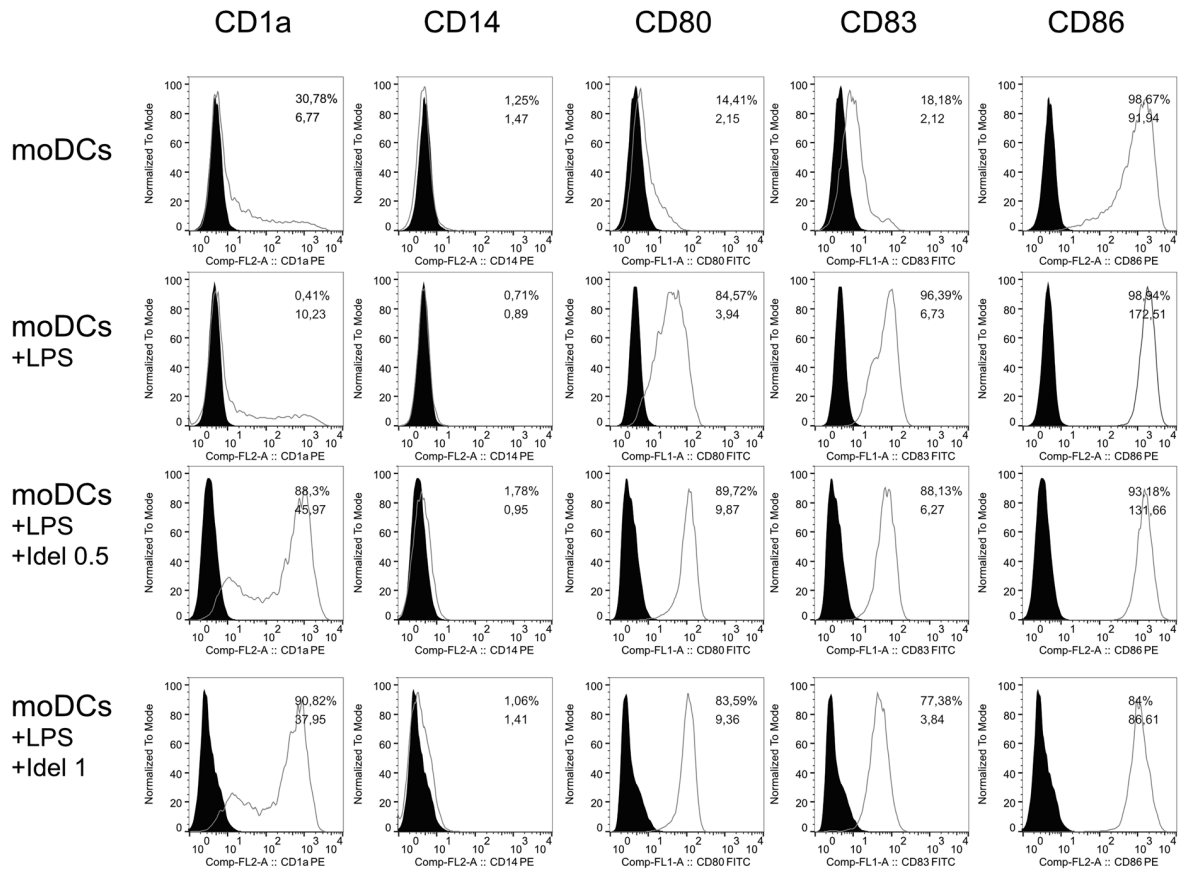
### Idelalisib alters the cytokine profile of LPS-matured DCs

Besides co-stimulatory signaling and antigen presentation, secretion of cytokines influences the induction of an immune response. Therefore, pro-inflammatory cytokines were analyzed after Idelalisib treatment and LPS stimulation. IL-12 and IL-2 are produced by DCs and are essential for T cell activation. Interferon  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), IL-4 and IL-13 induce or maintain T cell polarization. TNF $\alpha$  as a T cell effector molecule was measured. We detected significantly diminished levels of TNF $\alpha$ , IL-13 and IL-12 in Idelalisib-pretreated moDCs while levels of IL-2 and INF  $\gamma$  remained unchanged. In contrast, IL-4 secretion was even upregulated by Idelalisib treatment of immature moDCs, but this effect was abolished in mature moDCs (Fig. 4A).

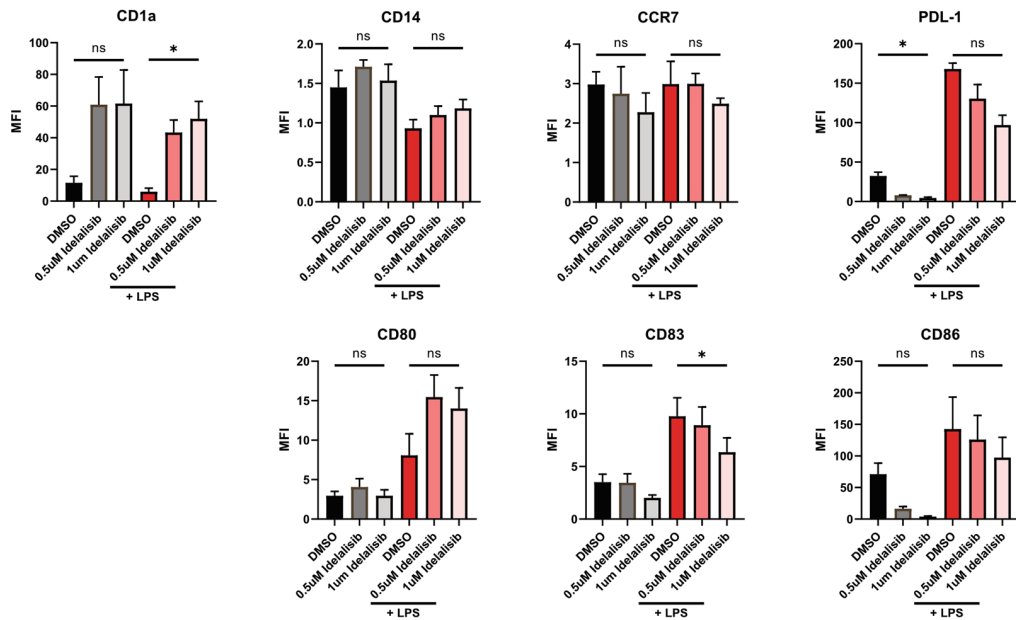
### Idelalisib inhibits the NF $\kappa$ B pathway downstream of PI3K $\delta$

Due to significant downregulation of relevant cytokines for T cell proliferation and function, we were interested in the

A



B



**Fig. 2** Modulation of co-stimulatory molecules by Idelalisib pre-treatment **A** MoDCs were generated in the presence of IL-4 and GM-CSF. Idelalisib was added every other day followed by subsequent LPS maturation on day 6, when indicated. Cells were harvested on day 7 and analyzed for expression of surface markers via FACS. Plots show mean fluorescent intensity (MFI) from one representative experiment. **B** MFI of surface molecules from three representative experiments were pooled and are shown. The significance was calculated according to the one-way ANOVA Dunnett multiple comparison test and is related to the vehicle control. \* $P < 0.05$

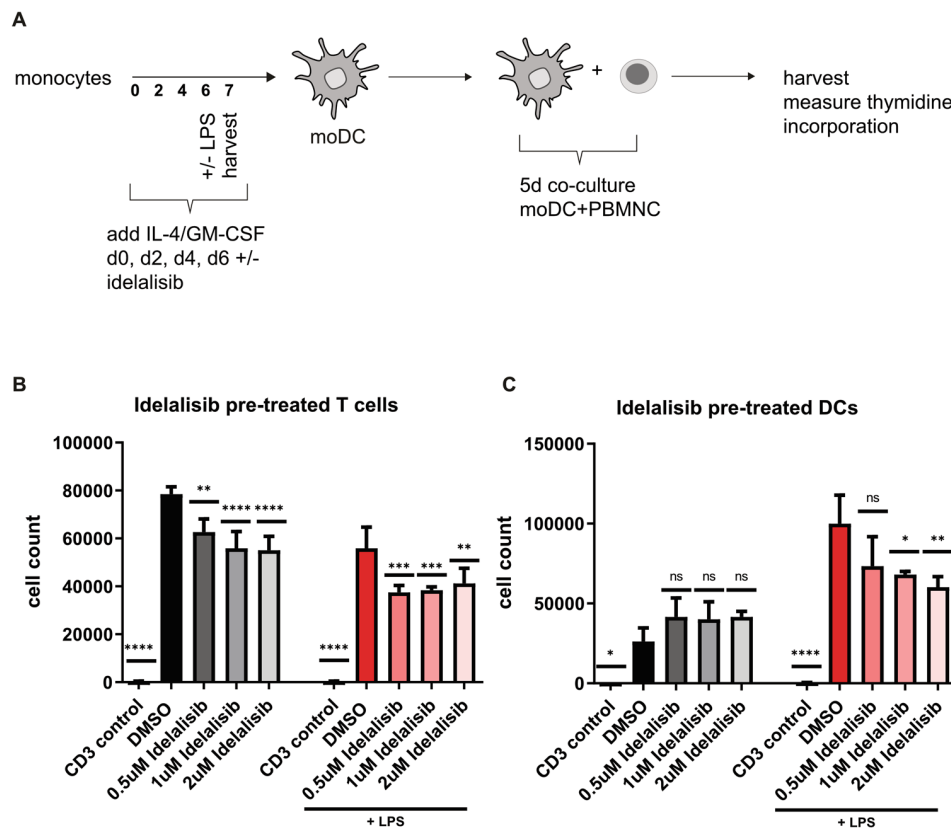
NF $\kappa$ B pathway, which is downstream of PI3K. For this purpose, we analyzed protein expression of Rel-B and c-Rel. LPS-induced upregulation of both proteins in moDCs, which was reduced by Idelalisib pre-treatment in a dose-dependent manner. Rel-A remained unchanged. (Fig. 4B). As expected, phosphorylation of PI3K was inhibited by Idelalisib. Neither

endogenous PI3K expression nor expression of p-STAT3 were altered. (Fig. 4C).

## Discussion

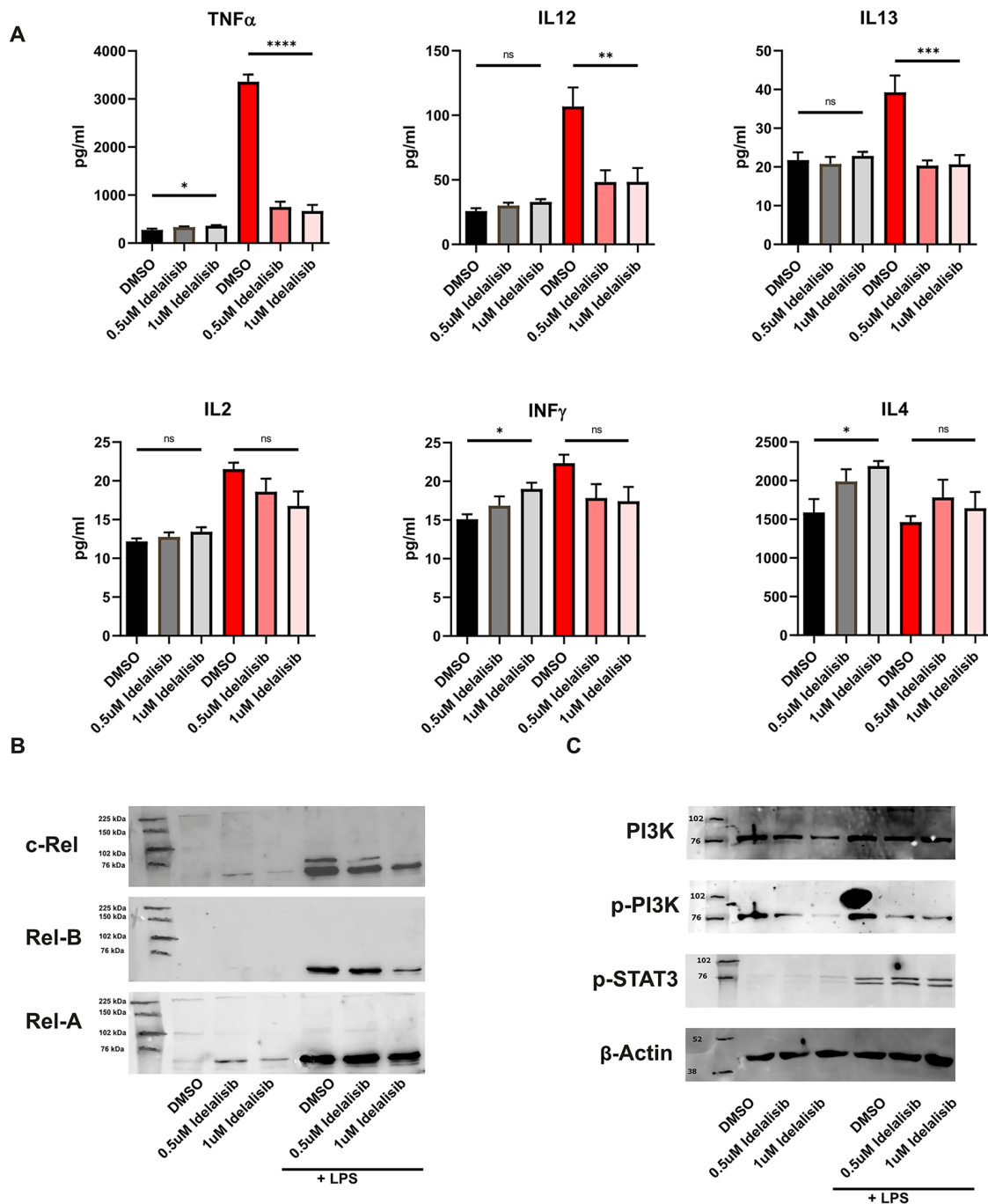
In the past decade, the treatment of Non-Hodgkin B cell lymphoma, such as FL and CLL, has evolved due to the discovery of novel drugs. Among small molecules and targeted therapies, Idelalisib, an inhibitor of PI3K $\delta$ , was a promising new candidate.

Nevertheless, pneumonitis, elevation of transaminases, colitis and diarrhea, as well as life-threatening infections, are serious side effects [3, 5] and have limited the treatment. Moreover, it has been shown that T cell-mediated immunity is dampened by Idelalisib treatment [6], and infectious



**Fig. 3** Idelalisib affects proliferation of allogeneic T cells in a DC-dependent manner **A** Schematic experimental design for a mixed lymphocyte reaction. Human monocytes cultured under DC-driving conditions with or without final LPS stimulation were exposed every other day to different concentrations of Idelalisib (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M on day 0, 2, 4 and 6) or DMSO throughout the differentiation period. Afterward, moDCs were co-cultured with allogeneic cells for five days. Thymidine incorporation was measured, and cell numbers were calculated. **B** T cells were co-incubated for 24 h with Idelalisib (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M). Washed cells were co-incubated with differ-

entiated moDCs naïve for Idelalisib treatment for 5 days and T cell counts 16 h after a 16 h pulse with [ $^3$ H]-thymidine are shown. Filled black graphs represent negative controls. **C** Monocytes were cultured under DC-driving conditions and treated with Idelalisib (0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M) every second day (day 0, 2, 4, 6), followed by LPS activation on day 6, when indicated. Pretreated moDCs were co-cultured with untreated T cells for an additional five days. T cell counts 16 h after a 16 h pulse with [ $^3$ H]-thymidine are shown. Filled black graphs represent negative controls



**Fig. 4** Idelalisib alters cytokine production by LPS stimulated moDCs and interferes with the NF $\kappa$ B pathway. **A** MoDCs were generated as described in the presence of Idelalisib followed by subsequent LPS maturation on day 6 when indicated. Supernatants were collected on day 7 and analyzed for cytokine expression. The significance was calculated according to the 1-way ANOVA Dunnett multiple comparison test and is related to the vehicle control. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ . **B** MoDCs generated in the presence of Idelalisib or DMSO were partly stimulated with LPS on day 6. 24 h later, protein was isolated, and lysates were analyzed for Rel-B, c-Rel and Rel-A expression. Representative western blots show upregulation of

Rel-a, Rel-B and c-Rel by TLR stimulation. Rel-B and c-Rel expression is dose-dependently inhibited by Idelalisib. Rel-A expression is unaffected by Idelalisib and serves as a loading control. **C** Protein was harvested from pretreated MoDCs as described above. Immunoprecipitates were analyzed for expression of PI3K, phosphorylated PI3K, phosphorylated STAT3 and  $\beta$  Actin by western blotting. Representative blots are shown. Idelalisib does not affect expression of PI3K and p-STAT3, but phosphorylation of PI3K is inhibited by Idelalisib. Equal protein amounts are confirmed by  $\beta$  Actin expression



complications are frequent [5]. Therefore, cytomegalovirus (CMV) monitoring as well as pneumocystis jirovecii pneumonia (PJP) prophylaxis are now mandatory. These infectious complications have led to a decreased and very cautious use of Idelalisib, and its replacement, by other new compounds in many cases in clinical routine [5]. However, the exact mechanisms mediating the immunosuppressive potential of Idelalisib have not been elucidated in detail yet.

Our report highlights that not only T cells and malignant B cells are targeted by PI3K $\delta$  inhibition but also DC differentiation and function are deeply modified by Idelalisib exposure *in vitro*. Differentiation of monocytes into moDCs using GM-CSF and IL-4 was markedly impaired by Idelalisib, which modulated proper DC differentiation and phenotype. For example, expression of CD83, which identifies mature DCs and is the most potent co-stimulatory molecule in the induction of allogeneic T cell proliferation, was impaired upon LPS exposure and Idelalisib treatment [10]. A decrease of CD83 expression due to Idelalisib co-culture may therefore emphasize the immature phenotype of these cells as well as their inability to induce T cell proliferation. As shown previously by a siRNA approach targeting human DCs *in vitro* [11], the downregulation of CD83 alone is sufficient for impaired T cell responses, even if expression of other co-stimulatory molecules is unaffected. The impaired DC function is further emphasized by diminished IL-12, IL-13 and TNF $\alpha$  secretion after LPS challenge. IL-13 production by DCs is important to maintain cytokine production in T helper 2 (Th2) cells [12]. IL-4, which is unchanged by Idelalisib treatment in mature moDCs, induces Th2 differentiation [13]. IL-13, in contrast, orchestrates survival and functionality of Th2 cells [12, 14]. Th2-type cytokines are increased during CMV infection [15] and proper cytokine production by Th2 cells, which is maintained by IL-13 derived from DCs, is necessary for CMV clearance.

IL-12 is a central cytokine in the induction of T cell responses [16], and adequate release of IL-12 is required to control primary CMV infection in a CD4 + T cell-dependent manner [17]. Aside from lymphopenia, the impaired release of IL-12 and IL-13 by DCs may thus contribute to the increased susceptibility of Idelalisib-treated patients to CMV infection. Additionally, we were able to show that direct inhibition of the NF $\kappa$ B pathway may be one-way how Idelalisib impairs DC function and phenotype. In line with our data, previous studies could underline the importance of the NF $\kappa$ B pathway in DC development and IL-12 production [18].

Another serious complication during Idelalisib treatment is PJP infection. It has been shown previously that TNF $\alpha$  is required for clearance of pneumocystis jirovecii [19] and reduced TNF $\alpha$  levels, as shown here, may be why Idelalisib treatment increases the risk of fatal PJP infection. However,

our results are limited because we only investigated the effect of Idelalisib on DC function and not on macrophages, which are a biologically significant source for TNF $\alpha$ .

Last, the inability of Idelalisib pretreated DCs to induce robust immune responses is stressed by the fact that DCs exposed to Idelalisib improperly stimulate allogeneic T cell proliferation, which is another prerequisite to induce a robust immune response after an infectious challenge. DCs activate naïve T cells via 3 signals: Antigen presentation (signal 1), co-stimulation (signal 2) and cytokine production (signal 3) [20]. Although we did not investigate antigen presentation, we could unveil modulation of co-stimulation and cytokine production by Idelalisib, which is further supported by our results regarding the induction of allogeneic T cell proliferation.

Our results may help to understand the restricted use of Idelalisib due to fatal infectious complications. Idelalisib modulates the expression of at least one co-stimulatory molecule and, more importantly, diminishes cytokine production by DCs *in vitro*. These cytokines are essential for proper T cell differentiation and polarization. Clinical infection with CMV and PCP may therefore not only be caused by defective T cell responses, but also by insufficient T cell polarization due to diminished cytokine release. Although our data were generated *in vitro*, clinical observations implicate relevance for our findings *in vivo*.

In contrast, suppression of T cells and DCs may open new therapeutic venues for PI3K $\delta$  inhibition. For example, in myeloproliferative neoplasms, which are driven by chronic inflammation [21], a clinical trial combining PI3K $\delta$  inhibition and standard treatment with the JAK inhibitor Ruxolitinib showed promising interim results in patients with myelofibrosis (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02718300). These promising results are supposed to be caused by direct effects of PI3K inhibition on malignant cells [22], but additional effects as shown in this work have to be investigated as well.

**Authors' contribution** CB and SND performed experiments, SS and AH analyzed results, made the figures and wrote the manuscript, AH and PB designed the research and discussed results.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was funded by the Deutsche Krebshilfe through a Mildred Scheel Nachwuchscenter Grant (Grant number 70113307 to S.S.) and supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG EXC2151–390873048 to A.H.).

**Data availability** The datasets generated during and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interests.

**Ethics approval** The study was conducted in accordance with the Declaration of HELSINKI and approved by the institutional ethics committee of the University of Bonn. (#173/09).

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F (2017) Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet* 390:298–310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32407-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32407-2)
- Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ et al (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase- $\delta$  inhibitor CAL-101 shows promising pre-clinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116:2078–2088. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271171>
- Furman RR, Sharman JP, Coutre SE et al (2014) Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 370:997–1007. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315226>
- Gopal AK, Kahl BS, de Vos S et al (2014) PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med* 370:1008–1018. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314583>
- de Weerd I, Koopmans SM, Kater AP, van Gelder M (2017) Incidence and management of toxicity associated with ibrutinib and idelalisib: a practical approach. *Haematologica* 102:1629–1639. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.164103>
- Martinelli S, Maffei R, Fiorcari S et al (2018) Idelalisib impairs T-cell-mediated immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 103:e598–e601. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.187070>
- Carbone FR, Kurts C, Bennett SRM et al (1998) Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19:368–373. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01301-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01301-2)
- Heine A, Held SAE, Daecke SN et al (2013) The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 122:1192–1202. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-484642>
- Koerber R-M, Held SAE, Heine A et al (2015) Analysis of the anti-proliferative and the pro-apoptotic efficacy of Syk inhibition in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol*. <https://doi.org/10.1186/s40164-015-0016-z>
- Zhou LJ, Tedder TF (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154:3821–3835
- Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S et al (2007) CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37:686–695. <https://doi.org/10.1002/eji.200636535>
- Bellinghausen I, Brand P, Böttcher I et al (2003) Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 108:167–176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01576.x>
- Junttila IS (2018) Tuning the cytokine responses: an update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>
- Yang L, Xu L-Z, Liu Z-Q et al (2016) Interleukin-13 interferes with activation-induced t-cell apoptosis by repressing p53 expression. *Cell Mol Immunol* 13:669–677. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.50>
- Essa S, Pacsa A, Raghupathy R et al (2009) Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc* 41:1643–1647. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.098>
- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133–146. <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- Popescu I, Pipeling MR, Mannem H et al (2016) Interleukin 12-dependent cytomegalovirus-specific CD4+ T cell proliferation, T-bet induction and effector multi-function during primary infection are key determinants for early immune control. *J Immunol Baltim Md* 196:877–890. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501589>
- Ouaaz F, Arron J, Zheng Y et al (2002) Dendritic cell development and survival require distinct NF- $\kappa$ B subunits. *Immunity* 16:257–270. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00272-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00272-8)
- Chen W, Havell EA, Harmsen AG (1992) Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 60:1279–1284
- Granucci F, Lutz MB, Zanoni I (2013) The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal 2. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00198>
- Hasselbalch HC, Bjørn ME (2015) MPNs as inflammatory diseases: the evidence, consequences, and perspectives. *Mediators Inflamm*. <https://doi.org/10.1155/2015/102476>
- Bartalucci N, Calabresi L, Balliu M et al (2017) Inhibitors of the PI3K/mTOR pathway prevent STAT5 phosphorylation in JAK2V617F mutated cells through PP2A/CIP2A axis. *Oncotarget* 8:96710–96724

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### 3. Danksagung

Allen voran möchte ich meiner ‚Doktormama‘ Prof. Dr. med. Annkristin Heine herzlich für die großartige Betreuung und ihre wissenschaftliche Expertise danken, aber auch für ihre Fähigkeit, mich immer wieder zu motivieren und auch an gescheiterten Versuchen noch etwas Positives zu finden. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können!

Prof. Dr. med. Peter Brossart danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Klinik anzufertigen sowie für sein Interesse an meinen Ergebnissen.

Dr. med. Sebastian Schlaweck danke ich für die fantastische Unterstützung bei der Auswertung der Daten, beim Schreiben des Papers und auch dem Korrekturlesen dieser Arbeit und mindestens genauso sehr für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meinem Laborteam um Solveig Daecke, Kati Riethausen, Tanja Riester und Philipp Kotthoff danke ich für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, die immerwährende Unterstützung, aber auch dafür, dass ich dank ihnen eine großartige Zeit im Labor hatte und den experimentellen Teil dieser Arbeit immer in guter Erinnerung behalten werde.

Dr. Janna Rudolph danke ich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und den allzeit netten Austausch und die Unterstützung.

Chrystel Flores danke ich für die Unterstützung und Einarbeitung bei allen Experimenten rund um das Thema Zytokine.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich auf meinem Weg bis zum und durch das Medizinstudium hindurch bis heute immer unterstützt haben, egal welche Umwege auf diesem Weg nötig waren und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Ich danke meiner Tochter Victoria und meinem Freund Robert dafür, dass sie die Fertigstellung dieser Arbeit geduldig ertragen haben und dafür, dass es sie gibt und sie mein Leben bereichern.